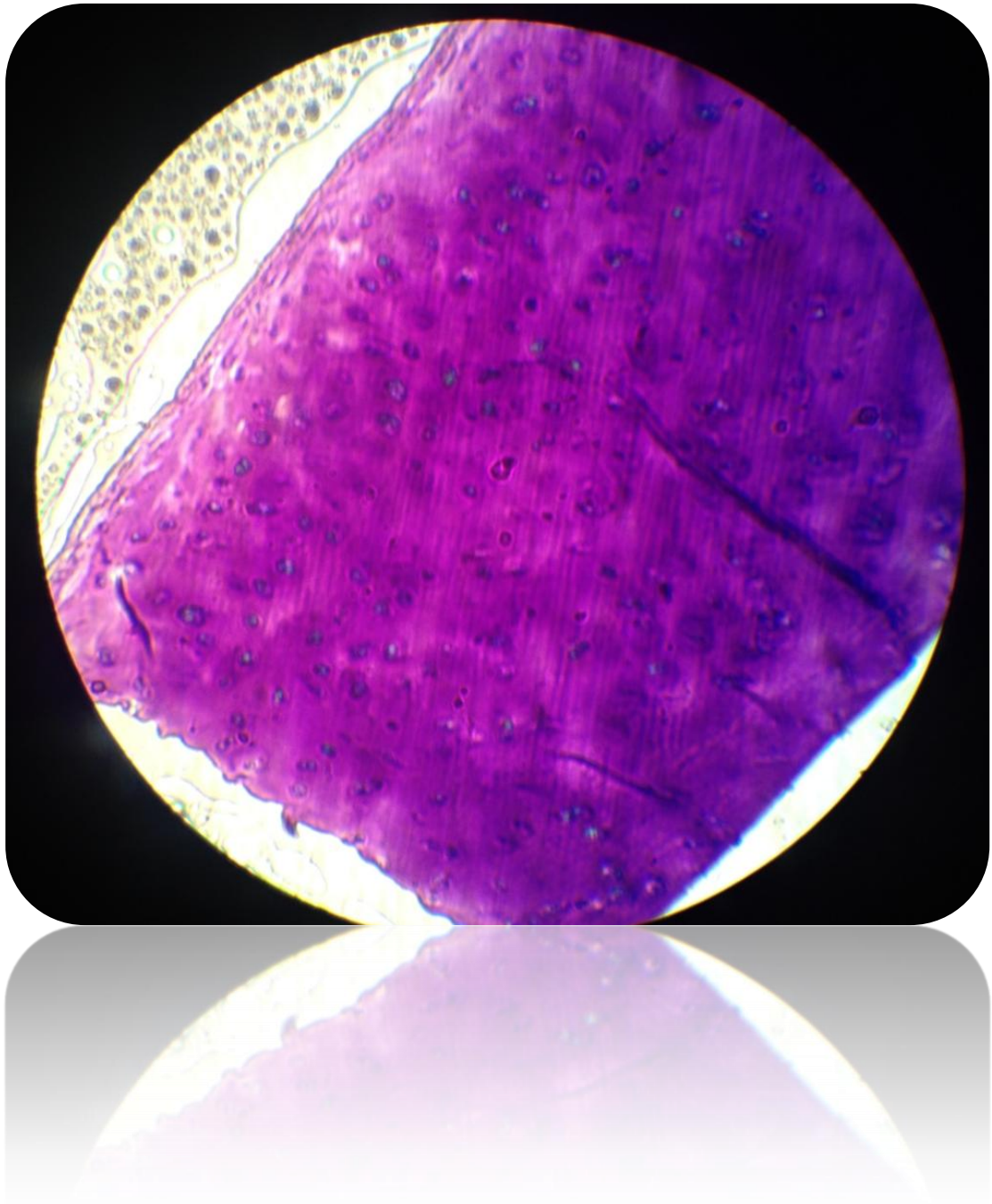


Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Τμήμα: Μηχανολόγων Μηχανικών
Τομέας: Κατασκευών Και Αυτόματου Ελέγχου

Cartilage Histology - Ιστολογία Χόνδρινου Ιστού



Λεκανίδης Στέφανος
Ποταμίτης – Κόμης Ελευθέριος

02109669
02109687

Περιεχόμενα

1. Περιεχόμενα.....	2
2. Ιστολογία.....	3
Ορισμός – Ιστορική Αναδρομή.....	3
Ιστοί.....	3
3. Προετοιμασία των ιστών για την ιστολογία με βαφή	6
Μονιμοποίηση	6
Επεξεργασία Ιστού	7
Τομή σε Μικροτόμο	8
Χρώση.....	8
4. Χόνδρινος Ιστός.....	10
Υαλοειδής Χόνδρος	11
Ινώδης Χόνδρος.....	12
Ελαστικός Χόνδρος.....	12
5. Χονδροκύτταρα.....	13
6. Θεμέλια ουσία	14
7. Αρθρώσεις	15
Διαρθρώσεις.....	16
Αρθρικός χόνδρος	16
8. Αρθρίτιδα.....	17
9. OARSI Scoring System	18
Βαθμός	18
Στάδιο	20
Συνολικός Βαθμός	20
10. Πειραματικό Πρωτόκολλο	22
Μονιμοποίηση	22
Επεξεργασία Ιστού	22
Τομή.....	23
Χρώση.....	24
11. Εικόνες από το Μικροσκόπιο.....	26
12. Συμπεράσματα και Προτάσεις.....	28
13. Βιβλιογραφία	29

Ιστολογία

Ορισμός – Ιστορική Αναδρομή

Η Ιστολογία είναι η επιστημονική μελέτη των ιστών του σώματος και του τρόπου με τον οποίο αυτοί συμβάλλουν, ώστε να σχηματισθούν τα όργανα. Τα τυπικά συστήματα οργάνων ενός οργανισμού που συγκροτούνται από ιστούς είναι το αναπνευστικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό σύστημα, το πεπτικό σύστημα, το απεκκριτικό σύστημα, το ερειστικό σύστημα, το μυϊκό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα, το ενδοκρινές σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα (μυελός των οστών θύμος) και το λεμφικό σύστημα (λεμφαδένες).

Ερευνητές που προετοίμασαν το έδαφος για τη σύγχρονη αυτή επιστήμη της ιστολογικής έρευνας θεωρούνται ο Γαληνός που πρώτος διέκρινε τη διαφορετικότητα κατασκευής των ιστών των οργανισμών, και ο Ιταλός Μάρκελος Μαλπίγκι (1628-1694) που είναι και ο πρώτος που εισήγαγε το μικροσκόπιο στη μελέτη κατασκευής των ζωικών οργάνων.

Ιδρυτής της Ιστολογίας θεωρείται ο Γάλλος ανατόμος Φρανσουά Μπισά (1771-1802) που θέσπισε τον όρο "ιστός" χαρακτηρίζοντας με αυτόν τα ομοιόμορφα μέρη του σώματος που όμως μελέτησε με γυμνό οφθαλμό. Από εκείνον άρχισε σιγά σιγά η νέα αυτή επιστήμη να εμπλουτίζεται σε γνώσεις με σειρές ανακαλύψεων και μάλιστα από τον Γάλλο Ρενέ Ντυτροσέ (1776-1847) που επιβεβαίωσε το 1824 τη κυτταρική θεωρία του Άγγλου Χουκ και του Ολλανδού Λεβενχόκ, τον Χούντερ που ανακάλυψε το 1825 τον πυρήνα των αιμοσφαιρίων, τον Άγγλο βοτανολόγο Ρόμπερτ Μπράουν (1773-1858) που περιέγραψε τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου, τον Γερμανό Μ. Σλάιντεν (1804-1881) που ολοκλήρωσε το 1838 τη μελέτη του φυτικού ιστού και κυττάρου και τον Γερμανό Σβαν (1810-1882) ο οποίος το 1839 έπραξε το ίδιο για το ζωικό κύτταρο και ιστό.

Από την εποχή του Σβαν μέχρι σήμερα η πρόοδος της ιστολογίας υπήρξε αλματώδης και που συνετέλεσε σ' αυτό οι τεχνικές κατακτήσεις που δημιούργησαν τον κλάδο της μικροσκοπικής τεχνικής που επιτρέπει σήμερα την κατασκευή μικροϊστολογικών παρασκευασμάτων, θαυμαστής τελειότητας, με τα οποία καθίστανται γνωστές και οι παραμικρές λεπτομέρειες της λεπτής υφής των ιστών και των οργάνων που συναποτελούν αυτά^[1].

Ιστοί

Οι ιστοί αποτελούνται από κύτταρα και από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται από πολλά είδη μορίων, μερικά από τα οποία εμφανίζουν υψηλό βαθμό οργάνωσης και σχηματίζουν πολύπλοκες δομές, όπως τα κολλαγόνα ινίδια και οι βασικές μεμβράνες.

Παλαιότερα θεωρούνταν ότι οι κύριες λειτουργίες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ήταν η εξασφάλιση της μηχανικής στήριξης, η προσκόμιση θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα και η απομάκρυνση των προϊόντων του μεταβολισμού και της εκκριτικής παραγωγής τους.

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει ότι αν και τα κύτταρα παράγουν τις εξωκυττάρια θεμέλιες ουσίες, επηρεάζονται και ενίοτι ελέγχονται από τα μόριά της, επομένως υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Επιπλέον πολλά μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αναγνωρίζονται από υποδοχείς που υπάρχουν επάνω στις επιφάνειες των κυττάρων, και προσκολλώνται σε αυτούς. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι μόρια που διατρέχουν όλο το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης και στη συνέχεια συνδέονται με τα μόρια εντός του κυτταροπλάσματος.

Με τον τρόπο αυτό, κύτταρα και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία σχηματίζουν μια συνεχόμενη βιολογική κατασκευή η οποία λειτουργεί ως ενιαίο σύνολο και έχει κοινή αντίδραση σε διεγερτικά και ανασταλτικά ερεθίσματα.

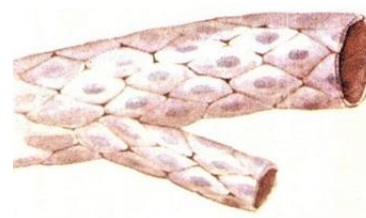
Ο καθένας από τους βασικούς ιστούς σχηματίζεται από αρκετά είδη κυττάρων, τα οποία δημιουργούν ειδικές, τυποποιημένες, σχέσεις σύνδεσης τόσο μεταξύ τους^[2].

Αναγνωρίζονται τέσσερις βασικοί τύποι ιστών : ο επιθηλιακός, ο νευρικός, ο συνδετικός ή ερειστικός, ο οποίος μας ενδιαφέρει στην παρούσα εργασία, και ο μυϊκός ιστός. Καθένας από αυτούς διαφοροποιείται σε επιμέρους τύπους κατά ειδικότερη δομή και φυσιολογία των κυττάρων τους.

Επιθηλιακός ιστός

Ο ρόλος του επιθηλιακού ιστού είναι κυρίως προστατευτικός. Απομακρύνει τη βλέννα και σκόνη και επιτρέπει τη διάχυση και την απορρόφηση ουσιών. Τέλος συμβάλει στην παραγωγή και στην έκκριση προϊόντων.

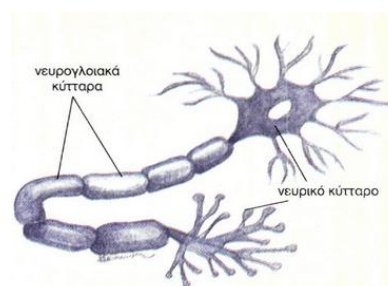
Ο επιθηλιακός ιστός αποτελείται από κύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, που σχηματίζουν επιφάνειες, οι οποίες καλύπτουν εξωτερικά το σώμα ή επενδύουν εσωτερικά διάφορες κοιλότητες. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν ποικίλη μορφολογία. Για παράδειγμα, αυτά που σχηματίζουν το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων ή των κυψελίδων είναι πεπλατυσμένα.



Πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα

Νευρικός ιστός

Ο νευρικός ιστός αποτελεί την βάση του νευρικού συστήματος το οποίο αποτελεί το σύστημα επικοινωνίας του σώματος. Η βάση του νευρικού ιστού είναι κάποια εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται νευρώνες και μεταφέρουν την πληροφορία μέσα στον οργανισμό. Επίσης εκκρίνουν βλέννα (όπως τα σώματα που καλύπτονται από βλεννογόνο ιστό) που παγιδεύει τα μικρόβια, τα οποία ωθούνται προς το εξωτερικό του οργανισμού.



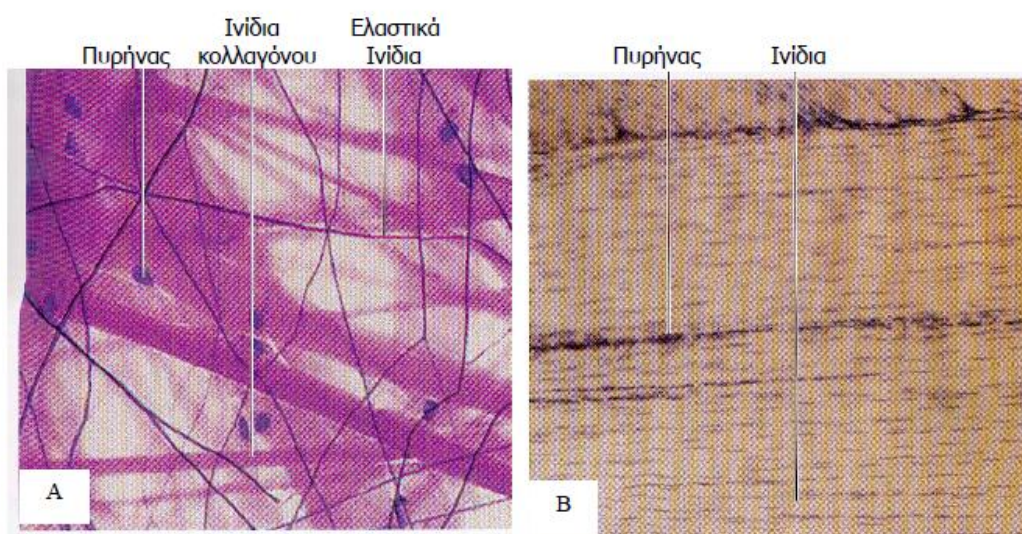
Συνδετικός / Ερειστικός ιστός

Ο ερειστικός ιστός ή συνδετικός ιστός, με την ευρεία έννοια του όρου, αποτελείται από κύτταρα που βρίσκονται σε άφθονη μεσοκυττάρια ουσία. Η μεσοκυττάρια ουσία είναι γνωστή να περιέχει 2 τύπους πρωτεϊνικών ινιδίων, τα ινίδια

κολλαγόνου, τα οποία προσφέρουν στη μεσοκυττάρια ουσία αντοχή και ελαστικότητα, και ελαστίνης, τα οποία αποδίδουν περισσότερη ελαστικότητα.

Ο συνδετικός ιστός χωρίζεται σε Χαλαρό και Πυκνό.

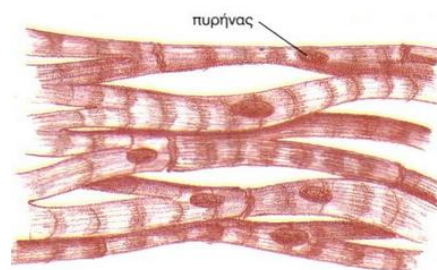
- Ο χαλαρός συνδετικός ιστός συναντάται στην επιδερμίδα. Η μεσοκυττάρια ουσία του περιέχει ινίδια κολλαγόνου και ελαστίνης. Ένας ειδικός τύπος συνδετικού χαλαρού ιστού είναι ο λιπώδης ιστός που αποτελείται από κύτταρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα αποθήκευσης λίπους (λιποκύτταρα).
- Ο πυκνός συνδετικός ιστός συναντάται στους αρθρικούς συνδέσμους και τένοντες που συνδέουν τους σκελετικούς μυς με τα οστά. Η μεσοκυττάρια ουσία του περιέχει ινίδια κολλαγόνου σε δεσμίδες.



(Α) Χαλαρός συνδετικός ιστός που περιέχει κολλαγόνες και ελαστικές ίνες.
(Β) Πυκνός συνδετικός ιστός σε παρασκευή τένοντα.

Μυϊκός ιστός

Ο μυϊκός ιστός αποτελείται από κύτταρα με σχετικά μεγάλο μήκος, που ονομάζονται μυϊκές ίνες. Είναι εξειδικευμένος για συσπάσεις και παραγωγή δύναμης. Χάρη στην ικανότητα των μυϊκών ινών να συστέλλονται, επιτυγχάνονται οι διάφορες κινήσεις των ζωικών οργανισμών. Στηρίζεται στην λειτουργία του μηχανισμού δύο ινωδών πρωτεϊνών της μυοσίνης και της ακτίνης. Στον άνθρωπο διακρίνουμε τρεις τύπους μυϊκού ιστού: το σκελετικό (απαντάται στους γραμμωτούς ή σκελετικούς μυς), τον καρδιακό (μυϊκός ιστός της καρδιάς) και τον λείο (απαντάται στο τοίχωμα των αγγείων και των σπλάχνων)^{[2],[12]}.



Προετοιμασία των ιστών για την ιστολογία με βαφή

Η συνηθέστερη διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ιστών, είναι η παρασκευή ιστολογικών τομών, οι οποίες μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου αφού πρώτα χρωματιστούν. Λόγω του ότι οι ιστοί και τα όργανα έχουν συνήθως μεγάλο πάχος τέτοιο ώστε να μην μπορεί να διαπεραστεί από το φως του μικροσκοπίου, είναι απαραίτητο να παρασκευαστούν πρώτα λεπτές τομές οι οποίες να είναι διαπερατές από το φως. Οι τομές αυτές επιτυγχάνονται με ακρίβεια μόνο εφόσον οι ιστοί έχουν προηγουμένως υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να είναι δυνατή η λεπτή κοπή τους με ειδικά όργανα, τους μικροτόμους. Η επεξεργασία αυτή χωρίζεται σε δύο διαδικασίες: την *μονιμοποίηση*, και την *επεξεργασία ιστού*. Η επεξεργασία ιστού χωρίζεται σε τέσσερα επιμέρους βήματα : την *αφυδάτωση* σε διαλύματα αιθανόλης, την *διαύγαση*, την *σκλήνωση* και τέλος την *έγκλειση*, τα οποία θα αναλύσουμε λεπτομερώς παρακάτω^{[2],[3]}.

Μονιμοποίηση

Για την αποφυγή της πέψης του ιστού από τα ένζυμα που υπάρχουν μέσα στα κύτταρα, ή από τα βακτήρια και για να διατηρηθεί η δομή και η μοριακή του σύνθεση πρέπει να υποστεί κατάλληλη επεξεργασία. Αυτή η επεξεργασία που ονομάζεται μονιμοποίηση είναι δυνατόν να γίνει με χημικές ή σπανιότερα με φυσικές μεθόδους(θα αναφερθεί στην έγκλειση).

Κατά την χημική μονιμοποίηση οι ιστοί συνήθως εμβαπτίζονται μέσα σε διαλύματα σταθεροποιητών ή διασυνδεδειγμένων χημικών ουσιών που ονομάζονται μονιμοποιητικά. Λόγω του ότι το μονοποιητικό χρειάζεται κάποιο χρόνο για να διεισδύσει στον ιστό, συνήθως οι ιστοί κόβονται σε μικρότερα κομμάτια πριν από την μονιμοποίηση, ώστε να διευκολυνθεί η ταχεία και έγκαιρη διείσδυση του μονοποιητικού, και με τον τρόπο αυτόν να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατόν αρτιότερη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του.

Το πιο συνηθισμένο μονοποιητικό που χρησιμοποιείται είναι το ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 4%, κοινώς φορμόλη. Επίσης αλλό ένα ευρέως μονοποιητικό που χρησιμοποιείται είναι η γλουταραλδεΰδη. Και τα δύο μονοποιητικά τα οποία ανήκουν στις αλδεΰδες αντιδρούν με τις αμινομάδες (NH_2) των πρωτεϊνών των ιστών. Στην περίπτωση της γλουταραλδεΰδης, η μονιμοποιητική δράση ενισχύεται από το γεγονός ότι, επειδή είναι μια διαλδεΰδη μπορεί να δημιουργήσει διασυνδέσεις, που ενώνουν μεταξύ τους τις πρωτεΐνες του ιστού.

Άλλα μονοποιητικά που χρησιμοποιούνται είναι τα B-5 και Zenker's τα οποία είναι άλατα υδραργύρου, και χρησιμοποιούνται συνήθως για την μονιμοποίηση του αιμοποιητικού και δικτυονδοθηλιακού ιστού (λέμφος, σπλήνα, θύμος, νωτιαίος μυελός). Επίσης χρησιμοποιούνται αλκόολες όπως την μεθανόλη και την αιθανόλη, οξειδωτικά όπως το υπερμαγγανικό κάλλιο(σπάνια σε εξειδικευμένες περιπτώσεις), το διχρωμικό κάλλιο και το τετροξείδιο του οσμίου και τέλος τα πικρικά με κυριότερο το Boulin's solution.

Για να επιτευχθεί καλύτερη μονιμοποίηση των ιστών, εφαρμόζεται ως τυπική διαδικασία η διπλή μονιμοποίηση, κατά την οποία χρησιμοποιείται ως πρώτο μονιμοποιητικό ένα ρυθμιστικό διάλυμα γλουταραλδεΰδης και κατόπιν ως δεύτερο μονιμοποιητικό χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου. Το τετροξείδιο του

οσμίου έχει την ιδιότητα να μονιμοποιεί και να χρωματίζει τα ιπίδια και τις πρωτεΐνες. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η διατήρηση των λεπτών δομικών λεπτομερειών του ιστού.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την μονιμοποίηση είναι :

- Το **pH** -> καλύτερη μονιμοποίηση σε ουδέτερο pH.
- Η **διαπερατότητα**.
- Ο **όγκος του μονιμοποιητικού** -> 10:1 μονιμοποιητή προς ιστό.
- Η **θερμοκρασία** -> μεγαλύτερη θερμοκρασία (μέσα σε βασικά όρια για να μην καταστραφεί ο ιστός) μεγαλύτερη ταχύτητα μονιμοποίησης.
- Η **συγκέντρωση** του μονιμοποιητή -> πρέπει όσο το δυνατόν να είναι μικρότερη για αποφυγή αλλοιώσεων του ιστού.
- Τέλος το **χρονικό διάστημα** από την αφαίρεση του ιστού μέχρι την μονιμοποίηση.

Επεξεργασία Ιστού

Μετά την διαδικασία της μονιμοποίησης, για την επίτευξη λεπτών τομών με τον μικροτόμο, οι ιστοί πρέπει να εμποτιστούν με υλικό έγκλεισης, το οποίο τους καθιστά σκληρούς ώστε να είναι δυνατή η τομή τους. Υλικά όπως η παραφίνη και οι πλαστικές ρητίνες χρησιμοποιούνται για αυτόν τον στόχο. Η παραφίνη χρησιμοποιείται ως συνήθως υλικό για τη μελέτη του ιστού με φωτομικροσκόπιο, ενώ οι ρητίνες χρησιμοποιούνται τόσο για το φωτομικροσκόπιο, όσο και για το ηλεκτρικό μικροσκόπιο.

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της έγκλεισης, πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθούν δύο βήματα, η **αφυδάτωση** και η **διαύγαση** του ιστού. Αρχικά αφαιρείται το νερό από τον ιστό μέσω της διαδοχικής τους παραμονής σε διαλύματα μειγμάτων αιθανόλης και ύδατος(συνήθως υδατικά διαλύματα αιθανόλης από 70% μέχρι και 100%. Στην συνέχεια η εντός του ιστού αιθανόλη αντικαθίσταται από ένα διαλύτη ο οποίος είναι αναμείξιμος με το υλικό έγκλεισης. Συγκεκριμένα για την παραφίνη ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι η ξυλόλη.

Στην περίπτωση που ο ιστός μας περιέχει οστό, λόγω της μεγάλης ποσότητας ασβεστίου που περιέχει, προσδίδεται στον ιστό μια στερεότητα που δεν επιτρέπει τον αποτελεσματικό εμποτισμό του στην παραφίνη. Για τον λόγο αυτόν ο ιστός πρέπει να υποστεί μια ειδική επεξεργασία αφαίρεσης του ασβεστίου πριν από την διεργασία της σκλήνωσης. Έτσι χρησιμοποιούνται μια σειρά από ουσίες, όπως νιτρικά και υδροχλωρικά οξέα, οργανικά οξέα, EDTA, ή τεχνικές (π.χ. ηλεκτρόλυση).

Τα νιτρικά και υδροχλωρικά οξέα χρησιμοποιούνται για τη ταχεία αφαίρεση μεγάλων ποσοτήτων ασβεστίου από πυκνά οστά. Το μειονέκτημά τους είναι ότι καταστρέφουν τη μορφολογία των κυττάρων και δεν συνίστανται για ευπαθείς ιστούς, όπως ο νωτιαίος μυελός. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται οργανικά οξέα (οξικό και μυρμηκικό οξύ).

Το EDTA δεν προκαλεί αλλοιώσεις στον ιστό, αλλά έχει χαμηλή ταχύτητα διαπερατότητας και υψηλό κόστος σε μεγάλες ποσότητες. Η ηλεκτρόλυση χρησιμοποιείται σε πειραματικές περιπτώσεις όταν είναι επιθυμητή η αφαίρεση του ασβεστίου με την ελάχιστη αλλοίωση του ιστού. Πρόκειται για εξαιρετικά αργή μέθοδο που δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ιστολογία ρουτίνας^[3].

Αφού ο ιστός διαποτισθεί πλήρως από το διαλύτη, πραγματοποιούμε το βήμα της **σκήνωσης**, όπου ο ιστός τοποθετείται μέσα σε λιωμένη παραφίνη και στη συνέχεια μέσα σε ένα κλίβανο με τυπική θερμοκρασία 50 – 60 ° C. Η θερμότητα που παρέχει ο κλίβανος στον ιστό προκαλεί την εξάτμιση του διαλύτη και την αντικατάσταση αυτού με τη λιωμένη παραφίνη. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται και για την έγκλειση με ρητίνη, αλλά με διαφορετικούς διαλύτες. Η έγκλειση σε πλαστικές ρητίνες όπως methyl methacrylate, glycol methacrylate, araldite, καιερν, προλαμβάνει το συρρικνωτικό αποτέλεσμα που δημιουργείται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που απαιτούνται για την έγκλειση σε παραφίνη έτσι δημιουργεί καλύτερα αποτελέσματα.

Τομή σε Μικροτόμο

Τέλος οι σκληροί κύβοι παραφίνης ή ρητίνης που περιέχουν τους ιστούς κόβονται σε τομές πάχους από 1 μm έως 10 μm σε μικροτόμο με χρήση χαλυβδίνης ή γυάλινης λεπίδας. Ύστερα οι τομές επιπλέουν σε ένα υδατολουτρό θερμοκρασίας από 40 μέχρι 50°C, όπου λαμβάνονται και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες για να γίνει η διαδικασία της χρώσης τους.

Αξίζει να αναφερθεί και ένας τελείως διαφορετικός τρόπος για την παρασκευή ιστολογικών τομών, αυτός είναι η υποβολή του ιστού σε ταχεία κατάψυξη. Κατά τη διαδικασία αυτή οι ιστοί μονιμοποιούνται με ψύξη (φυσικός τρόπος), οπότε ταυτόχρονα σκληραίνουν και είναι δυνατή η κοπή



τους σε λεπτές τομές με τη βοήθεια του ψυκτικού μικροτόμου που ονομάζεται κρυοστάτης. Επειδή η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταχεία παρασκευή τομών, χωρίς την απαίτηση της διαδικασίας της έγκλεισης χρησιμοποιείται στα νοσοκομεία για τη ταχεία μελέτη παρασκευασμάτων, η οποία διενεργείται κατά την διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης^[3].

Χρώση

Οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να διακρίνουμε τα διάφορα συστατικά τους που μας ενδιαφέρουν με το φωτομικροσκόπιο. Για τον λόγο αυτόν έχουν επινοηθεί διάφορες μέθοδοι χρώσης των ιστών οι οποίες κάνουν ορατά τα συστατικά αυτών.

Οι περισσότερες χρωστικές ουσίες διαχωρίζονται σε όξινες και βασικές, ανάλογα με το πώς συμπεριφέρονται. Έτσι τα συστατικά που βάφονται καλύτερα με βασικές χρωστικές χαρακτηρίζονται ως βασεόφιλα, ενώ εκείνα που βάφονται καλύτερα με όξινες χρωστικές χαρακτηρίζονται ως οξεόφιλα. Το κυανό της τολουιδίνης και το κυανό του μεθυλενίου είναι

χαρακτηριστικά παραδείγματα βασικών χρωστικών ουσιών. Η αιματοξυλίνη αν και δεν είναι καθαρά βασική χρωστική, συμπεριφέρεται ως αυτή, δηλαδή βάφει τα φασεόφιλα συστατικά του ιστού. Τα κύρια συστατικά που αντιδρούν με τις βασικές χρώσεις είναι τα πυρηνικά οξέα, οι γλυκοζαμινογλυκάνες και οι όξινες γλυκοπρωτεΐνες. Η ηωσίνη, η Orange G, και οξίνη φουξίνη είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα όξινων χρωστικών ουσιών. Τα κύρια συστατικά που αντιδρούν με τις όξινες βαφές είναι τα μιτοχόνδρια, τα εκκριτικά κοκκία και το κολλαγόνο.

Γενικά ο συνηθέστερος συνδιασμός χρωστικών ουσιών που χρησιμοποιείται είναι της αιματοξυλίνης με την ηωσίνη (A&H). Η αιματοξυλίνη βάφει με κυανό χρώμα κυτταρικό πυρήνα, μέρη του κυτταρόπλασματος που είναι πλούσια σε RNA και την θεμέλια ουσία του υαλοειδούς χόνδρου. Αντίθετα η ηωσίνη βάφει με ανοιχτό ερυθρό χρώμα, το κυτταρόπλασμα, και το κολλαγόνο.

Άλλες χρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι τρίχρωμες στρώσεις Mallory και Masson, η ελαστική χρώση Weigert, και ο διαποτισμός με άργυρο. Τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται παρακάτω^[3].

Συνήθεις χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ιστολογία (Από Κοντόπουλος, 1980)

Τεχνικές	Στοιχεία	Πυρήνας	Κυτόπλασμα	Κολλαγόνο	Ελαστικές ίνες	Δικτυωτές ίνες
A και H	Αιματοξυλίνη & Ηωσίνη	Σκούρος γαλάζιος	Ρόδινο	Ρόδινο	Ακανόνιστα	---
Τρίχρωμη χρώση Masson	Σιδηρούχα αιματοξυλίνη, όξινη φουξίνη, Ponceau 2R, ανοιχτό πράσινο	Μαύρος	Κόκκινο	Πράσινο	---	Πράσινες
Ελαστική χρώση Weigert	Ρεσορκίνη, φουξίνη, HCl, αιματοξυλίνη, πικρικό οξύ, Ponceau, πυκνό οξεϊκό οξύ	Φαίος	Κίτρινο	Κόκκινο	Μαύρες	---
Διαποτισμός με άργυρο	Διάλυμα αλάτος αργύρου	---	---	Σκούρο καφέ	---	Μαύρες

Χόνδρινος Ιστός

Ο **χόνδρος** είναι ένα ημίσκληρο είδος στηρικτικού ιστού, τα χαρακτηριστικά του οποίου πηγάζουν κυρίως από τη φύση και την αφθονία της θεμέλιας ουσίας στον εξωκυτταρικό χώρο. Οι πρωτεογλυκάνες εναποτίθενται σε συσσωρεύσεις εκατό ή περισσότερων μορίων που συνιστούν τη θεμέλια ουσία και ευθλυνονται για τη συμπαγή, αλλά παρόλα αυτά εύκαμπτη, σύσταση του χόνδρου. Οι θειωμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (ΓΑΓ) κυριαρχούν στις συσσωρεύσεις των πρωτεογλυκανών, ενώ τα μόρια του υαλουρονικού οξέος (μη θειωμένη ΓΑΓ), σχηματίζουν τη ραχοκοκκαλιά του συμπλέγματος. Στο εσωτερικό της θεμέλιας ουσίας βρίσκονται καθηλωμένες διάφορες αναλογίες κολλαγόνων κι ελαστικών ινών, σχηματίζοντας έτσι τις τρεις κύριες μορφές χόνδρου : τον *υαλοειδή χόνδρο*, τον *ινώδη χόνδρο*, και τον *ελαστικό χόνδρο*.

Ο **σχηματισμός** του χόνδρου αρχίζει με τη διαφοροποίηση των αστεροειδών αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν τα υποστρόγγυλα πρόδρομα κύτταρα του χόνδρου που ονομάζονται *χονδροβλάστες*. Οι μιτωτικές διαιρέσεις που ακολουθούν δημιουργούν αθροίσματα στενά τοποθετημένων χονδροβλαστών που αναπτύσσονται και ξεκινούν τη σύνθεση θεμέλιας ουσίας και ινώδους εξωκυττάριου υλικού. Η έκκριση του εξωκυττάριου υλικού παγιδεύει κάθε χονδροβλάστη στο εσωτερικού της χονδρογενούς ουσίας, διαχωρίζοντας έτσι τη μία χονδροβλάστη από την άλλη. Στη συνέχεια κάθε χονδροβλάστη υφίσταται μια ή δυο περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις για το σχηματισμό μιας μικρότερης ομάδας ώριμων κυττάρων που διαχωρίζονται από μικρό ποσό εξωκυττάριου υλικού. Τα ώριμα κύτταρα του χόνδρου γνωστά ως *χονδροκύτταρα*, διατηρούν την ακεραιότητα της χόνδρινης μεσοκυττάριας ουσίας. Αυτή η αλληλουχία διαφοροποίησης και ωρίμανσης είναι πιο προηγμένη στο κέντρο μιας μάζας αναπτυσσόμενου χόνδρου.

Προς την **περιφέρεια του χόνδρου**, οι χονδροβλάστες που βρίσκονται σε πιο ώριμα στάδια διαφοροποίησης συγχωνεύονται με τον περιβάλλοντα χαλαρό στηρικτικό ιστό. Κατά την ολοκλήρωση της αύξησης, η χόνδρινη μάζα αποτελείται από χονδροκύτταρα εγκλωβισμένα σ' ένα μεγάλο ποσό εξωκυττάριας ουσίας. Στην περιφέρεια του ώριμου χόνδρου βρίσκεται μια ζώνη συμπυκνωμένου στηρικτικού ιστού που ονομάζεται *περιχόνδριο* και περιέχει χονδροβλάστες με δυναμικό σχηματισμό χόνδρου. Η αύξηση του χόνδρου πραγματοποιείται διαμέσου του πολλαπλασιασμού των χονδροβλαστών εντός της θεμέλιας ουσίας (διαμέση αύξηση) και μέσω της ανάπτυξης νέων χονδροβλαστών από τον περιχόνδριο (αποθετική αύξηση).

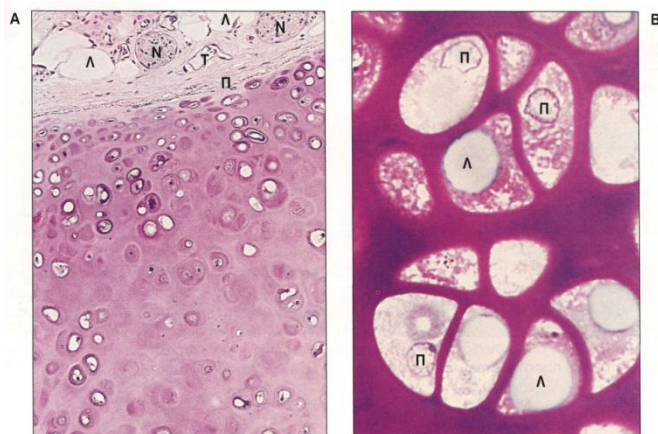
Το μεγαλύτερο μέρος του χόνδρου δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία και επομένως η ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ των χονδροκυττάρων και των ιστών που τα περιβάλλουν εξαρτάται από τη διάχυση ουσιών διαμέσου των ενυδατωμένων-αρνητικά φορτισμένων γλυκοζαμινογλυκανών της θεμέλιας ουσίας. Αυτό περιορίζει το πάχος του χόνδρου, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί τη βιωσιμότητα των εσωτερικών κυττάρων. Σε περιοχές που ο χόνδρος είναι ιδιαίτερα παχύς (π.χ. πλευρικός χόνδρος), οι σωλήνες του χόνδρου μεταφέρουν μικρά αγγεία προς το κέντρο της μάζας^[4].

Υαλοειδής Χόνδρος

Ο **υαλοειδής χόνδρος** αποτελεί το συνηθέστερο είδος χόνδρου και βρίσκεται στο ρινικό διάφραγμα, στα λάρυγγα, στα τριχοειδή δακτύλια, στις περισσότερες αρθρικές επιφάνειες και στα στερνικά άκρα των πλευρών. Επίσης, σχηματίζει τον προσωρινό σκελετό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ο ώριμος υαλοειδής χόνδρος χαρακτηρίζεται από μικρές συσσωρεύσεις χονδροκυττάρων εγκλωβισμένων σε άμορφη θεμέλια ουσία που ενισχύεται από ίνες κολλαγόνου.

Στο παρασκεύασμα του ώριμου υαλοειδούς χόνδρου παρατηρούνται δύο ζώνες : μια εσωτερική, έντονα βασεόφιλη ζώνη και μια ανοιχτόχρωμη περιφερική ζώνη που συγχωνεύεται με τον παρακείμενο στηρικτικό ιστό που περιέχει λιποκύτταρα, τριχοειδή και μικρά νεύρα. Τα χονδροκύτταρα της εσωτερικής ζώνης είναι οργανωμένα σε χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχουν συνήθως δυο ή τέσσερα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι ομάδες διαχωρίζονται από μια μεγάλη μάζα άμορφης χόνδρινης ουσίας, ενώ τα κύτταρα κάθε ομάδας διαχωρίζονται από μια λεπτή στιβάδα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Στα συνήθη ιστολογικά παρασκευάσματα ο σημαντικός βαθμός συρρίκνωσης διαστρεβλώνει τις κυτταρικές λεπτομέρειες των χονδροκυττάρων, έτσι ώστε να μοιάζουν σαν να μην καταλαμβάνουν πλήρως το χώρο τους μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

Επεκτεινόμενα από την εσωτερική ζώνη προς την εξωτερική επιφάνεια του χόνδρου, τα χονδροκύτταρα είναι προοδευτικά λιγότερο διαφοροποιημένα, έτσι ώστε τα κύτταρα του περιχόνδριου στην επιφάνεια να μοιάζουν με ώριμες ινοβλάστες. Παρατηρήστε ότι τα κύτταρα του περιχόνδριου δεν διαρούνται για να σχηματίσουν ομάδες. Η μορφολογική



Εικόνα 10.1. Υαλοειδής χόνδρος [Α] Χρώση Α-Η x 150 [Β] Λεπτή τομή, κυανό της τολουιδίνης x 1200.

διαβάθμιση των χονδροκυττάρων από το περιχόνδριο προς τα πιο ώριμα χονδροκύτταρα της εσωτερικής ζώνης αντιπροσωπεύει τις προοδευτικές μεταβολές που πραγματοποιούνται κατά την ανάπτυξη του χόνδρου. Στον ενήλικο χόνδρο η κυτταρική διαφοροποίηση στο περιχόνδριο και στην περιφέρεια του χόνδρου καταστέλεται, εκτός εάν επιτελεστεί διέγερση της αύξησης. Κατά τη διέγερση της αύξησης απομονωμένα χονδροκύτταρα διαιρούνται για το σχηματισμό ομάδων, προάγοντας έτσι τη διάμεση αύξηση, ενώ κατά τον ίδιο χρόνο οι χονδροβλάστες του περιχόνδριου διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, οδηγώντας έτσι σε αύξηση μέσω εναπόθεσης νέου υλικού (αποθετική αύξηση)^[4].

Η εξωκυττάρια ουσία του υαλοειδούς χόνδρου φαίνεται σχετικά άμορφη, καθώς η θεμέλια ουσία και το κολλαγόνο έχουν παρόμοιες διαθλαστικές ιδιότητες. Η ποικίλουσα

ένταση χρώσης της χόνδρινης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των όξινων θεικών πρωτεογλυκανών, η οποία είναι μέγιστη γύρω από τις ομάδες των πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων και ελάχιστη στο περιχόνδριο.

Ζώνες

Ο ώριμος αρθρικός χόνδρος (υαλοειδής χόνδρος) αποτελείται από 4 στοιβάδες (ζώνες):

- 1) Την επιφανειακή
- 2) Τη μεταβατική
- 3) Την ακτινωτή
- 4) Την αποτιτανωμένη

Πολλές φορές η μεταβατική και η ακτινωτή ζώνη αναφέρονται και ως μεσαία. Τα χονδροκύτταρα κάθε ζώνης διαφοροποιούνται ως προς το σχήμα και τη διάταξη τους στο χώρο. Το σχήμα των κυττάρων εξαρτάται επίσης από το είδος, τη θέση και την ωριμότητα του χόνδρινου ιστού. Η επιφανειακή ζώνη αποτελείται από κύτταρα επίπεδα και πεπλατυσμένα, τα οποία είναι διατεταγμένα παράλληλα με την επιφάνεια. Σχηματίζεται έτσι μια επιφανειακή μεμβράνη, η επιδερμίδα του χόνδρου, που η αντοχή της και η διατήρηση της συνεχείας της, παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας. Η μεταβατική ζώνη περιλαμβάνει κύτταρα με αραιή και άτακτη διάταξη. Η ακτινωτή ζώνη απαρτίζεται από κύτταρα μικρότερου μεγέθους, τα οποία είναι στοιβαγμένα σε κάθετες στήλες, και τέλος η αποτιτανωμένη ζώνη με πυκνωτικά κύτταρα, αποτελεί τη ζώνη μεταβάσεως – συνδέσεως χόνδρου και υποχόνδριου οστού^[7].

Ινώδης Χόνδρος

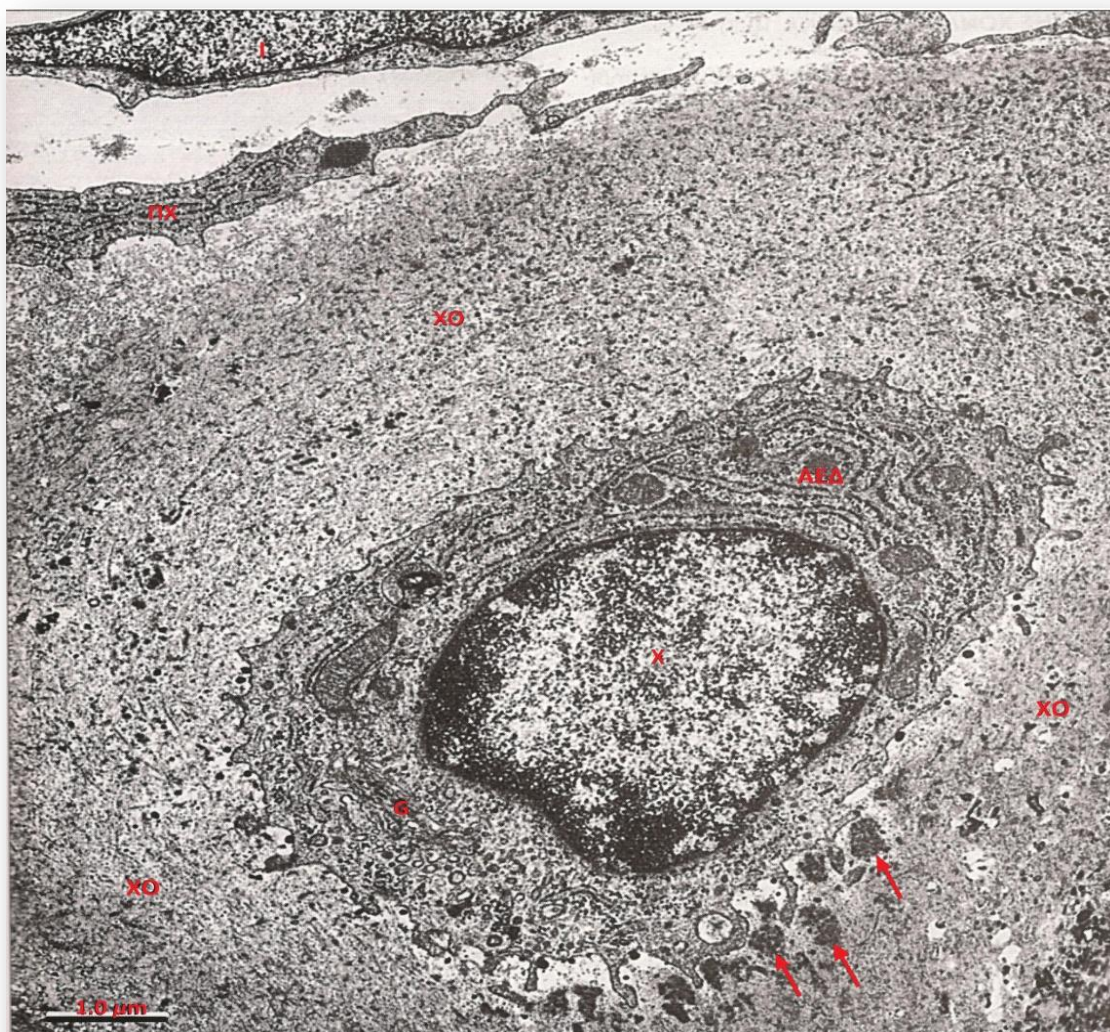
Ο **ινώδης χόνδρος**, ο οποίος έχει χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ του χόνδρου και του πυκνού ινώδους στηρικτού ιστού, βρίσκεται στους μεσοσπονδύλιους δίσκους, σε μερικούς αρθρικούς χόνδρους, στην ιβική σύμφυση και σε συνδυασμό με πυκνό κολλαγονώδη ιστό στους αρθρικούς θυλάκους, στους συνδέσμους και στις θέσεις πρόσφυσης μερικών τενόντων στα όστα. Ο ινώδης χόνδρος αποτελείται από εναλλασόμενες στιβάδες υαλοειδούς χόνδρινης θεμέλιας ουσίας και παχιές στιβάδες πυκνών κολλαγόνων ινών προσανατολισμένες προς τη κατεύθυνση των λειτουργικών καταπονήσεων.

Ελαστικός Χόνδρος

Ο **ελαστικός χόνδρος** παρατηρείται στο πτερύγιο του ωτός, στο τοίχωμα του έξω ακουστικού πόρου, στην επιγλωτίδα, σε μέρη των λαρυγγικών χόνδρων και στα τοις ευσταχιανής σάλπιγγας. Η ιστολογική δομή του ελαστικού χόνδρου είναι πορόμοια μ' εκείνη του υαλοειδούς χόνδρου, αλλά πάντως η ελαστικότητα του προέρχεται από την παρουσία πολυάριθμων δεσμίδων διακλαδιζόμενων ελαστικών ινών μέσα στη χόνδρινη θεμέλια ουσία. Αυτό το δίκτυο των ελαστικών ινών είναι ιδιαίτερα πυκνό στην περιοχή γύρω από τα χονδροκύτταρα. Επίσης, το κολλαγόνο αποτελεί το μείζον συστατικό της χόνδρινης θεμέλιας ουσίας και συνιστά τον κυτταρικό όγκο του περιχόνδριου, αναμιγμένο με μερικές ελαστικές ίνες. Η ανάπτυξη του ελαστικού χόνδρου πραγματοποιείται τόσο με διάμεση όσο και με αποθετική αύξηση κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στον υαλοειδή χόνδρο^[4].

Χονδροκύτταρα

Σε αυτή τη φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης απεικονίζεται ένα χονδροκύτταρο μέσα στο οστικό βοθρίο του, περιβαλλόμενο από χόνδρινη θεμέλια ουσία (ΧΟ). Στην επιφάνεια διακρίνεται επίσης μέρος του κυτταροπλάσματος ενός επίπεδου περιχονδρικού χονδροκυττάρου (ΠΧ). Πίσω από αυτό, στον παρκείμενο στηρικτικό ιστό, βρίσκεται ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα μιας ινοβλάστης (Ι). Τα χονδροκύτταρα εξαιτίας της ανακύκλωσης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας έχουν άφθονο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ), του οποίου οι δεξαμενές παρουσιάζουν διάταση λόγω του εκκριτικού υλικού που περιέχουν. Το χαρακτηριστικό αυτό στοιχείο παρατηρείται στα κύτταρα με ενεργό πρωτεϊνοσύνθεση. Αντιθέτως, παρατηρήστε την απουσία ΑΕΔ στην ινοβλάστη. Εμφανής είναι η πλήρως αναπτυγμένη συσκευή Golgi (G). Κοκκία γλυκογόνου βρίσκονται διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα. Παρατηρήστε ότι το χονδροκύτταρο καταλαμβάνει πλήρως το βοθρίο του μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Μικρές κυτταροπλασματικές προεκβολές εξυπηρετούν τη διαρκή αλληλεπίδραση μεταξύ των χονδροκυττάρων και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Σ' αυτή τη μεγένθυση μόλις που διακρίνονται τα ινώδη στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Το ηλεκτροπυκνωτικό υλικό δίπλα στην εν τω βάθει επιφάνεια του κυττάρου (με βέλη) αντιπροσωπεύει υλικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που έχει εκκριθεί πρόσφατα.



Εικόνα 10.2. Χονδροκύτταρα (HM x 16000).

Στον πλήρως σχηματισμένο χόνδρο τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας ανανεώνονται συνεχώς, επομένως η ακεραιότητα της εξωκυττάριας ουσίας εξαρτάται ολοκληρωτικά από τη βιωσιμότητα των χονδροκυττάρων^[4].

Θεμέλια ουσία

Όλοι οι στηρικτικοί / συνδετικοί ιστοί έχουν δύο κύρια συστατικά, τα **κύτταρα** και την **εξωκυττάρια θεμέλια ουσία**. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία καθορίζει τις φυσικές ιδιότητες των διαφόρων τύπων του στηρικτικού ιστού. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται από ένα οργανικό υπόστρωμα που ονομάζεται 'θεμέλια ουσία', εντός της οποίας εντοπίζεται μι αποικιλία από ίνες. Μία ομάδα δομικών γλυκοπρωτεϊνών αποτελεί το τρίτο συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας που ασκεί μεσολαβητικό ρόλο μεταξύ των κυττάρων και των υπολοίπων συστατικών.

Η **θεμέλια ουσία** αποτελείται από μείγμα επιμήκων γραμμικών μη διακλαδισμένων αλυσίδων πολυσακχαριτών, οι οποίοι διαιρούνται σε επτά διαφορετικούς αντιπροσωπευτικούς τύπους, κάθε ένας από τους οποίους αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δυσασκαριτών. Μια από τις δισακχαριδικές μονάδες είναι συνήθως το ουρανικό οξύ και ένα αμινο-σάκχαρο, αποδίδοντας έτσι τη σύγχρονη ονομασία **γλυκοζαμινογλυκάνες** (ΓΑΓς). Οι ΓΑΓς είναι όζινες λόγω της παρουσίας πλευρικών ομάδων υδροξυλίου, καρβοξυλίου και θειϊκού οξέος στις δισακχαριδικές μονάδες.

Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί την κυρίαρχη ΓΑΓ των χαλαρών στηρικτικών ιστών, ενώ είναι η μόνη μη θειούχος ΓΑΓ. Οι υπόλοιπες ΓΑΓς (4-θειϊκή χονδροϊτίνη, 6-θειϊκή χονδροϊτίνη, θειϊκή δερματάνη, θειϊκή ηπαράνη, θειϊκή ηπαρίνη, θειϊκή κερατάνη) διαφέρουν από το υαλουρονικό οξύ στο ότι είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με μία ποικιλία πρωτεϊνικών μορίων για το σχηματισμό των **πρωτεογλυκανών**. Αυτές οι πρωτεογλυκάνες είναι τεράστια μόρια που αποτελούνται από 90-95% υδατάνθρακες. Επιπλέον οι πρωτεογλυκάνες μπορούν να συνδέονται με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς με αλυσίδες υαλουρονικού οξέος για το σχηματισμό ακόμη μεγαλύτερων μοριακών συμπλεγμάτων.

Σε αντίθεση με αρκετές πρωτεΐνες, τα μόρια των ΓΑΓ δεν είναι αρκετά εύκαμπτα ώστε να σχηματίζουν συμπαγή συσσωματώματα σφαιρικού σχήματος, Αλλά παραμένουν σε μια ανοικτή ελικοειδή μορφή, καταλαμβάνοντας έτσι πολύ μεγάλο όγκο σε σχέση με τη μικρή μάζα τους. Επιπλέον, οι έντονα φορτισμένες πλευρικές ομάδες τις καθιστούν εξαιρετικά υδρόφιλες, προσελκύοντας έτσι μεγάλο όγκο νερού και θετικών ιόντων, ιδιαιτέρως νατρίου, στοιχχεία τα οποία συνιστούν το εξωκυττάριο υγρό. Οι ΓΑΓς εξαιτίας της συνδεσής τους με το εξωκυττάριο υγρό σχηματίζουν έντονα ενυδατωμένες δομές που προσδίδουν σπαργή στο στηρικτικό ιστό^[5].

Περίληπτικά, η θεμέλια ουσία αποτελείται βασικά από γλυκοζαμινογλυκάνες (ΓΑΓ) με τη μορφή του υαλουρονικού οξέος και από πρωτεογλυκάνες. Αυτά τα τεράστια μόρια αλληλοδιαπλέκονται μεταξύ τους και εν'πώνονται ηλεκτροστατικά το ένα με το άλλο και με το νερό που τα συνοδεύει, σχηματίζοντας μια εύκαμπτη ζελατινοειδή ουσία που

διευκολύνει τη διάχυση των μεταβολιτών. Το μέγεθος των διαστημάτων μεταξύ των μορίων των ΓΑΓ και η φύση των ηλεκτροστατικών μεταβολών καθορίζουν τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας των διαφόρων μορφών του στηρικτικού ιστού, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία σδομή των βασικών μεμνρανών. Οι μηχανικές ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας ενισχύονται από τις ινιδικές πρωτεΐνες του εξωκυττάριου ιστού, στις οποίες προσδένονται επίσης τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας.

Τα ινώση συστατικά του στηρικτικού ιστού ανήκουν σε δυο κύριες κατηγορίες : το κολλαγόνο και η ελαστίνη.

Το **κολλαγόνο** αποτελεί το κύριο ινιδικό συστατικό που εντοπίζεται στους περισσότερους στηρικτικούς ιστούς και αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη στον ανθρώπινο οργανισμό. Η υπο αξιοσημείωτη λειτουργία του κολλαγόνου είναι η παροχή δυνάμεων έκτασης στους ιστούς. Το κολλαγόνο εκκρίνεται στην εξωκυττάρια ουσία με τη μορφή του τροποκολλαγόνου, το οποίο αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες μεταξύ τους για; το σχηματισμό μια ελικοειδούς δομής μήκους 300nm και διαμέτρου 1.5nm. Στην εξωκυττάρια ουσία τα μόρια τροποκολλαγόνου πολυμερίζονται γιατο σχηματισμό του κολλαγόνου. Έχουν περιγραφεί 11 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου με βάση τη μορφολογία τους, την περιεκτικότητα του σε αμινοξέα και τις φυσικές ιδιότητες τους. Το κολλαγόνο είναι οξεόφιλο λόγω των θετικά φορτισμένων πλευρικών ομάδων, οπότε στα συνήθη ιστολογικά παρασκευάσματα το κολλαγόνο είναι ηωσινόφιλο (δηλαδή έχει ροζ χρώμα).

Το **κολλαγόνο τύπου II** εντοπίζεται στον υαλοειδή χόνδρο και αποτελείται από λεπτά ινίδια που κατανέμονται διάσπαρτα στη θεμέλια ουσία.

Αρθρώσεις

Οι αρθρώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κύριες λειτουργικές ομάδες, τις διαρθρώσεις και τις συναρθρώσεις που μπορεί να παρουσιάζουν μεγάλες μορφολογικές διακυμάνσεις.

Διαρθρώσεις. Σ' αυτό το είδος άρθρωσης υπάρχει μεγάλη κινητικότητα μεταξύ των οστών στην περιοχή των αρθρικών επιφανειών. Οι τελευταίες συγκρατούνται σε παράθεση μέσω μιας ινώσους κάψας και συνδέσμων, ενώ λιπαίνονται με το αρθρικό υγρό. Σε μερικές διαρθρώσεις, όπως η κροταφογναθική και του γόνατος, μεταξύ των αρθρικών επιφανειών μπορεί να παρεμβάλλονται μερικώς ή πλήρως κάποιοι ινοχόνδρινοι δίσκοι, οι οποίοι όμως δεν έρχονται σε επαφή με τις αρθρικές επιφάνειες.

Συναρθρώσεις. Αυτές οι αρθρώσεις έχουν περιορισμένη κινητικότητα, καθώς τα αρθρούμενα οστά δεν έχουν ελεύθερη αρθρική επιφάνεια, αλλά μάλλον ενώνονται μεταξύ τους με πυκνό κολλαγονώδη ιστό. Αυτός μπορεί να είναι τριών ειδών:

- **Πυκνός ινώδης ιστός:** αυτός σχηματίζει τις ραφές μεταξύ των οστών του κρανίου και επιτρέπει τη συμπίεση του εμβρυϊκού κρανίου κατά τη δίοδο του μέσα από

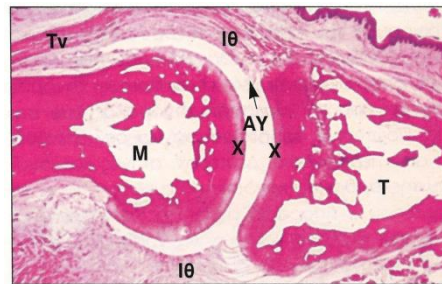
το γεννητικό σωλήνα. Οι ραφές προοδευτικά ατिकाθίστανται από οστό με την πάροδο του χρόνου. Αυτές οι αρθρώσεις ινώδους ιστού ονομάζονται *συνδεσμώνσεις*, ενώ όταν αντικατασταθούν από οστό ονομάζονται *συνοστώσεις*.

- *Υαλοειδής χόνδρος* : αυτό το είδος άρθρωσης, που ονομάζεται συγχόνδρωση ή πρωτογενής χόνδρινη άρθρωση, ενώνεται την πρώτη πλευρά με το στέρνο και αποτελεί τη μοναδική συγχόνδρωση που βρίσκουμε στο ώριμο ενήλικα.

- *Ινώδης χόνδρος* : Οι αντιπαρατιθέμενες επιφάνειες μερικών οστών καλύπτονται από υαλοειδή χόνδρο, αλλά αντί ενός αρθρικού διαστήματος συνδέονται συνδέονται απευθείας μεταξύ τους μέσω ενός ινοχόνδρινου δίσκου. Αυτές οι ινοχόνδρινες αρθρώσεις ονομάζονται συμφύσεις ή δευτερογενείς χόνδρινες αρθρώσεις και παρατηρούνται στην ηβική σύμφυση και στους μεσοσπονδύλιους δίσκους. Ο ινοχόνδρινος δίσκος της ηβικής σύμφυσης αναπτύσσει μια κεντρική κοιλότητα, ενώ οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι εμφανίζουν μια κεντρική κοιλότητα που καταλαμβάνεται από υγρό^[6].

Διαρθρώσεις

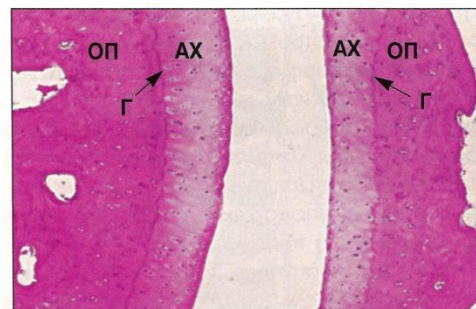
Σ' αυτή τη φωτογραφία απεικονίζεται μια τυπική διάρθρωση και συγκεκριμένα η άνω μεσοφαλαγγική άρθρωση του δακτύλου του άνω άκρου. Οι αρθρικές επιφάνειες της τελικής (**T**) και της μεσαίας (**M**) φάλαγγας καλύπτονται από υαλοειδή χόνδρο (**X**). Το αρθρικό διάστημα έχει διαπλατηνθεί με τεχνικές μεθόδους. *In vivo* οι αρθρικές επιφάνειες συγκρατούνται κοντά η μια στην άλλη μέσω ενός ινώδους θυλάκου (**ΙΘ**), ο οποίος προσφύεται μέσα στα αρθρούμενα οστά σε κάποια απόσταση πίσω από τους αρθρικούς χόνδρους. Ο αρθρικός υμένας (**ΑΥ**) αποτελεί μια εξειδικευμένη στιβάδα κολλαγονώδους ιστού που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του θυλάκου. Παρατηρήστε τον εκτείνοντα τένοντα (**Tv**) που προσφύεται στη βάση της τελικής φάλαγγας.



Εικόνα 10.24. Διάρθρωση Πιθηκός. Χρώση Α - Η x 12).

Αρθρικός χόνδρος

Αυτή η φωτογραφία εστιάζει στους αντιπαρατιθέμενους αρθρικούς χόνδρους (**ΑΧ**) της διάρθρωσης που παρουσιάζεται στην προηγούμενη φωτογραφία. Κάθε αρθρικός χόνδρος ενώνεται με το μαρκό οστό του σε μια περιοχή που ονομάζεται οστέινη τελική πλάκα (**ΟΠ**). Αυτή η περιοχή συντίθεται από ένα ασύνηθες είδος οστού χωρίς αβέρσεια συστήματα και σωληνίσκους, στο οποίο τα οστεοκύτταρα καταλαμβάνουν ιδιαίτερα μεγάλες κοιλότητες. Ο αρθρικός χόνδρος οριοθετείται έντονα από την υποκείμενη οστέινη τελική πλάκα από μια παχιά στιβάδα



Εικόνα 10.25. Αρθρικός χόνδρος. Χρώση Α - Η x 20).

υλικού πλούσιου σε γλυκοπρωτεΐνη (**Γ**), που μοιάζει με τις συγκολλητικές γραμμές του οστού που φέρει αβέρσεια συστήματα^[6].

Αρθρίτιδα

Η παθογένεια της αρθρίτιδας αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη και σε πολλά σημεία άγνωστη διαδικασία. Η έναρξη των παθολογικών διεργασιών από κάποιο παθογενετικό παράγοντα οδηγεί σε καταστροφή του αρθρικού χόνδρου είτε απ' ευθείας είτε με τη συνεργεία και άλλων παραγόντων, που επιτείνουν και επιταχύνουν την εξέλιξη. Διακρίνουμε τρεις κατηγορίες παθογενετικών παραγόντων οι οποίοι δρουν μόνοι ή και σε συνδυασμό, προκαλώντας μόνιμες βλάβες του αρθρικού χόνδρου. Οι παράγοντες αυτοί είναι προδιαθεσικοί, ενδογενείς και εξωγενείς^{[7],[8]}.

Οι **προδιαθεσικοί παράγοντες** περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλο, την παχυσαρκία και τις μηχανικές ή ανατομικές ιδιαιτερότητες ορισμένων αρθρώσεων.

Οι **ενδογενείς παράγοντες** μπορεί να είναι γενετικοί, ανοσοβιολογικοί, κυκλοφορικοί (υπέρταση, φλεβική στάση) ή μεταβολικοί (ζαχαρώδης διαβήτης, υπερουριχαιμία, ενζυματικές διαταραχές).

Οι **εξωγενείς παράγοντες** είναι μηχανικοί και χημικοί. Οι μηχανικοί παράγοντες δρουν με την αύξηση των φορτίων ανά μονάδα αρθρικής επιφάνειας, η οποία αύξηση ξεπερνάει την αντοχή του χόνδρου και τον καταστρέφει. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και η πλήρης αποφόρτιση μιας άρθρωσης, όπου όμως η καταστροφή οφείλεται στη διαταραχή της τροφικότητας του χόνδρου. Στους χημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται κυτταροτοξικές ουσίες, που επιδρούν δυσμενώς στον κυτταρικό μεταβολισμό (π.χ. η κορτιζόνη ενεργοποιεί την ενζυματική δράση κολλαγονολυτικών ενζύμων, που διασπούν πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο της θεμέλιας ουσίας).

Οι **αρθροπάθειες** διακρίνονται σε :

1. Ατροφικές (μετατραυματική αρθρίτιδα, οστεονέκρωση)
2. Υπερτροφικές (εκφυλιστική αρθρίτιδα)
3. Αντιδραστικές (μεταβολικά νοσήματα, χημική αρθροπάθεια)
4. Φλεγμονώδεις (από ρευματικά ή ανοσολογικά νοσήματα ή από μικροβιακή φλεγμονή)

OARSI Scoring System

Δύο είναι τα βασικά χαρακτηριστικά τα οποία προσδιορίζουν την σοβαρότητα της Οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ) και αυτά είναι ο **βαθμός (ή κλάση) (grade)** και το **στάδιο (stage)**. Συνδυάζοντας αυτά τα δύο χαρακτηριστικά μπορούμε να αποδώσουμε ένα **συνολικό βαθμό (score)** στο εκάστοτε δείγμα που να προσδιορίζει την βαθμό παθογένειας του^{[9],[10]}.

Στην ΟΑ, ο **βαθμός** ορίζεται ως η εξέλιξη της νόσου κατά το βάθος του. Με τη βοήθεια του βαθμού υποδεικνύεται η σοβαρότητα ή η βιολογική εξέλιξη της οστεοαρθριτικής διαδικασίας. Όσον αφορά το **στάδιο**, αυτό με την σειρά του ορίζεται ως η οριζόντια έκταση της επιφάνειας του χόνδρου που εμπλέκεται στην οστεοαρθριτική διαδικασία χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο υποκείμενος βαθμός. Ο **συνολικός βαθμός** ορίζεται ως μια εκτίμηση που συνδυάζει τα δύο προαναφερθέντα χαρακτηριστικά, δηλαδή τον βαθμό της ΟΑ και το στάδιο της αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του συγκεκριμένου συστήματος που αναλύεται είναι ότι ανεξαρτήτως του βιολογικού μηχανισμού που εμπλέκεται στην διαδικασία της ΟΑ, οι πρώτες αλλαγές στην μορφολογία του εντοπίζονται στην περιοχή της επιφάνειας του.

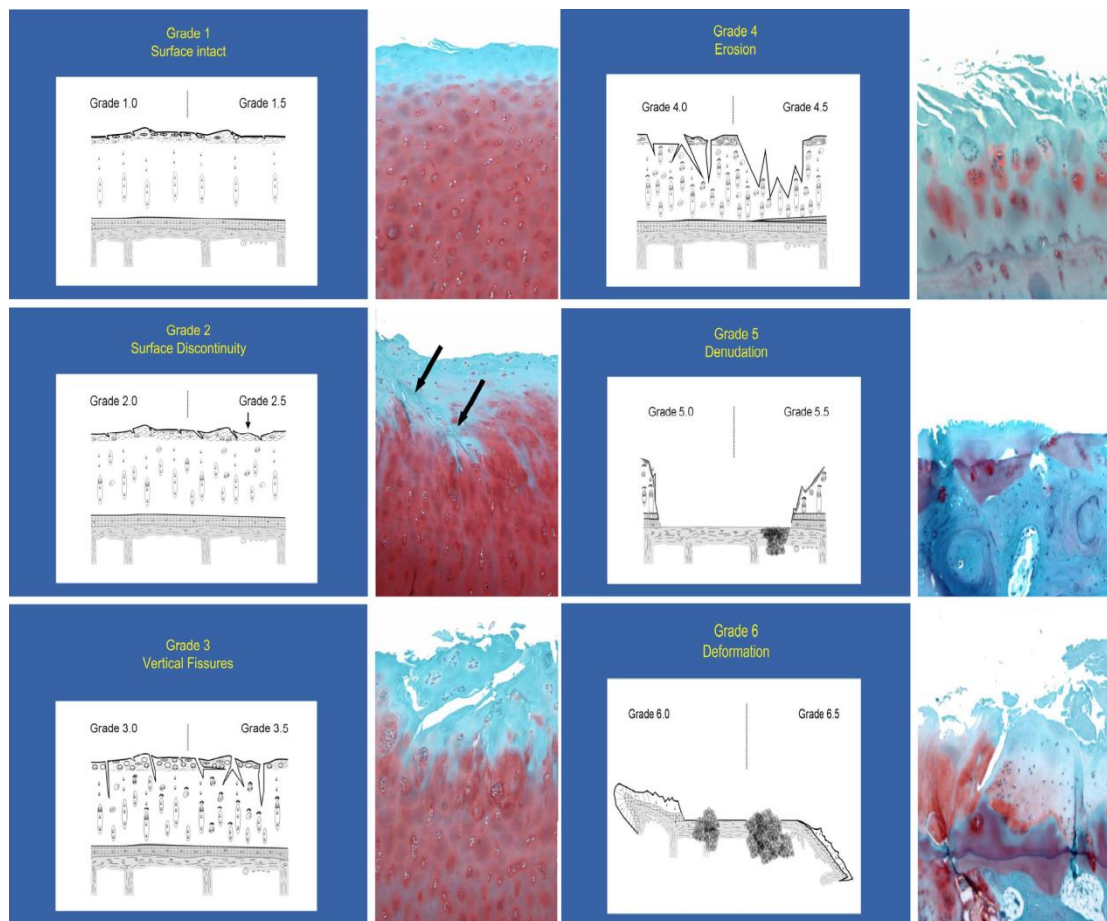
Βαθμός

Βαθμός 0 – Ως βαθμός 0 ορίζεται ο υγιής υαλοειδής χόνδρος (Εικόνα 5.6), η επιφάνεια του οποίου είναι λεία.

Βαθμός 1 : Εξ' ορισμού ο βαθμός 1 αποτελεί το κατώφλι της ΟΑ για τον χόνδρο. Ο βαθμός αυτός χαρακτηρίζεται από διατήρηση γενικά του επιφανειακού στρώματος, παρόλα αυτά παρατηρούνται ελαφρές εκδορές, «επιφανειακή ινοποίηση» όπως αναφέρεται συνήθως. Άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά του βαθμού 1 αποτελούν το τοπικό ή γενικευμένο οίδημα, δηλαδή πρήξιμο, της μητρικής ουσίας το οποίο αν αναπτυχθεί σε υπερβολικό βαθμό τότε ο χόνδρος οδηγείται στην κατάσταση της υπερτροφίας.

Βαθμός 2 : Ο βαθμός 2 χαρακτηρίζεται από εστιακή ασυνέχεια της επιφανειακής ζώνης. Σε αυτό τον βαθμό, εκδορές που οφείλονται σε διατμητικές δυνάμεις οδηγούν στην απώλεια μικρών τμημάτων της επιφανειακής μητρικής ουσίας.

Βαθμός 3 : Στον βαθμό 3 της ΟΑ παρατηρείται μία επέκταση των ρωγμών μέχρι τη μεσαία ζώνη. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, στα πλαίσια αυτού του βαθμού πάντα, παρατηρείται μία διακλάδωση αυτών των κάθετων σχισμών, δηλαδή παρατηρείται και η εμφάνιση κάποιων σχισμών οι οποίες βρίσκονται σε γωνία σε σχέση με τις κάθετες που ήδη προϋπάρχουν.



Βαθμός 4 : Χαρακτηριστικό γνώρισμα του βαθμού 4 της ΟΑ είναι η διάβρωση του χόνδρου. Δύο ξεχωριστές διαδικασίες μπορούν να διαχωριστούν και αυτές είναι η 92 αποκόλληση (delamination) και η εκσκαφή (excavation). Η αποκόλληση περιλαμβάνει την απώλεια ολόκληρου τμήματος της επιφανειακής ζώνης ως αποτέλεσμα των διατμητικών φορτίων. Η εκσκαφή αφορά την δημιουργία κάποιας κοιλότητας που σχετίζεται με την απώλεια μητρικής ουσίας σε μια οριοθετημένη περιοχή του χόνδρου. Αυτό είναι πιθανό επακόλουθο της επέκτασης και της συνένωσης επιμέρους σχισμών.

Βαθμός 5 : Ο Βαθμός 5 της ΟΑ αναγνωρίζεται από απογύμνωση, απόλυτη διάβρωση του υαλοειδούς χόνδρου στο επίπεδο του ανοργανοποιημένου χόνδρου ή οστού, με παράλληλη αναδόμηση της επιφάνειας του οστού ή όχι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρορωγμών στην οστική πλάκα η οποία ακολουθείται από την προσπάθεια επιδιόρθωσης τους με ινώδη χόνδρο. Έτσι, ένα τμήμα του απογυμνωμένου οστού μπορεί να είναι ινώδης χόνδρος.

Βαθμός 6 : Ο βαθμός 6 της ΟΑ χαρακτηρίζεται από παραμόρφωση του περιγράμματος της αρθρικής επιφάνειας. Αυτό είναι αποτέλεσμα όχι μόνο των ρωγμών που υπάρχουν στην αρθρική πλάκα αλλά ακόμα και της αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας της αρθρικής οστικής πλάκας, όπως επίσης και της ενεργοποίησης του συνδετικού ιστού στις πλευρικές και ακόμα μερικές φορές και στις κεντρικές διεπιφάνειες χόνδρου/οστού.

Στάδιο

Τέσσερα είναι τα στάδια της ΟΑ που έχουν οριστεί, και καθορίζονται από την οριζόντια επέκταση της νόσου στην αρθρική επιφάνεια, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο βαθμός του υποκείμενου χόνδρου. Το πρώτο στάδιο αφορά τις αρθρώσεις των οποίων λιγότερο από το 10% της επιφάνειας του έχει εμπλακεί στις οστεοαρθρικές διεργασίες. Το στάδιο 2 αντιπροσωπεύει τις επιφάνειες με 10 - <25%, το στάδιο 3 αντιπροσωπεύει το 25 - <50% και τέλος το στάδιο 4 αφορά τις επιφάνειες που έχουν προσβληθεί πάνω από 50% (Πίνακας 5.2). Η διαδοχή των σταδίων αυτών αντιπροσωπεύει μία εκθετική παρά μία γραμμική εξέλιξη της νόσου. Επομένως αυτή η μεθοδολογία είναι πιο ευαίσθητη στα πρώτα πιο ελαφρά στάδια της νόσου σε σχέση με μια γραμμική μέθοδο. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες περιοχές που έχουν πληγεί από την ΟΑ είναι συνεχείς, ενώ ο υποκείμενος βαθμός της ΟΑ μπορεί να ποικίλει. Για ασυνεχείς περιοχές ΟΑ, το στάδιο θεωρείται ως το σύνολο των επιμέρους περιοχών σε σχέση με την συνολικά αρθρική επιφάνεια^{[9],[10]}.

Table IV
OA cartilage histopathology—stage assessment

Stage	% Involvement (surface, area, volume)
Stage 0	No OA activity seen
Stage 1	<10%
Stage 2	10–25%
Stage 3	25–50%
Stage 4	> 50%

Stage = extent of joint involvement.

Συνολικός Βαθμός

Όπως αναφέρθηκε και πρωτίτερα ο συνολικός βαθμός της ΟΑ είναι μία συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου (βαθμός της ΟΑ) και της έκτασης της (στάδιο ΟΑ) για έναν δεδομένο αρθρικό χόνδρο. Ο συνολικός βαθμός μπορεί να προσδιορισθεί χρησιμοποιώντας είτε ποιοτικές, ημι-ποσοτικές ή ποσοτικές μεθόδους. Το είδος της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος των ζητούμενων πληροφοριών. Δηλαδή επιλέγεται η μέθοδος που θα μας δώσει τις ζητούμενες πληροφορίες πιο εύκολα, και κυρίως εξαρτάται από το αν γίνει σύγκριση οστεοαρθρικών δειγμάτων με κάποιο control δείγμα ή αν γίνει σύγκριση μεταξύ δύο set οστεοαρθρικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που απαιτείται σύγκριση μίας ομάδας δειγμάτων με κάποια control δείγματα οι ποιοτικές ή οι ημι- ποσοτικές μέθοδοι κρίνονται επαρκείς. Ενώ, αν απαιτείται σύγκριση μεταξύ περιοχών χόνδρου στο ίδιο μοντέλο τότε οι ποσοτικές μέθοδοι προτείνονται αναμφισβήτητα^{[9],[10]}.

Προτεινόμενη μεθοδολογία απόδοσης συνολικού βαθμού: Ο προτεινόμενος συνολικός βαθμός προκύπτει από ένα κατάλογο αριθμών που έχουν προκύψει από τον συνδυασμό των επιμέρους βαθμών και σταδίων. Η εξίσωση που προτείνεται για την πλήρωση του καταλόγου αυτού είναι η απλή: Συνολικός Βαθμός = Βαθμός x Στάδιο

Table V
OA score—semi-quantitative method

Grade	Stage			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

Score = grade × stage.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο της βιοϊατρικής τεχνολογίας για την πραγματοποίηση της ιστολογίας είναι φαίνεται παρακάτω χωρισμένη σε στάδια^[11]:

Μονιμοποίηση

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της μονοποίησης έγιναν τα εξής βήματα:

1. Βάζουμε τον ιστό σε διάλυμα φορμόλης συγκέντρωσης 10% σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες.
2. Σε περίπτωση που έχει οστό πρέπει να γίνει αφαίρεση του ασβεστίου με όξινο διάλυμα για 6 έως 12 ώρες, τα προτεινόμενα διαλύματα είναι: Cal – Ex, Fisher Scientific, Cat # : CS510 – 1D. Μετά από αυτήν την διαδικασία το οστό θα πρέπει να είναι μαλακό και να κάμπτεται εύκολα
3. Εμβαπτίζουμε τον ιστό σε αποσταγμένο νερό από 30 λεπτά έως 1 ώρα.
4. Τέλος φυλάσσουμε τον ιστό σε διάλυμα 70% αιθανόλη για όσο επιθυμούμε.

Επεξεργασία Ιστού

Όπως έχουμε αναφέρει η επεξεργασία ιστού χωρίζεται σε τέσσερα βήματα, την αφυδάτωση, την διαύγαση, την σκλήνωση και την έγκλειση.

i. Αφυδάτωση

Για την πραγματοποίηση της αφυδάτωσης, εμβαπτίζουμε τον ιστό σε διαδοχικά λουτρά αιθανόλης διαφορετικών περιεκτικοτήτων ως εξής.

1. Αιθανόλη 70% για 1 ώρα
2. Αιθανόλη 96% για 30 λεπτά
3. Αιθανόλη 96% για 30 λεπτά
4. Αιθανόλη 96% για 30 λεπτά
5. Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά
6. Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά
7. Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά

ii. Διαύγαση

Για την πραγματοποίηση της διαύγασης, εμβαπτίζουμε τον ιστό σε διάλυμα ξυλόλης ως εξής. (Χρησιμοποιούμε ξυλόλη ως διαλύτη γιατί το υλικό έγκλεισης που θα χρησιμοποιηθεί είναι η παραφίνη).

1. Ξυλόλη για 1 ώρα
2. Ξυλόλη για 1 ώρα

iii. Σκλήνωση

Για την πραγματοποίηση της σκλήνωσης εμποτίζουμε τον ιστό μας με το υλικό έγκλεισης στην περίπτωση μας σε λιωμένη παραφίνη σε φούρνο στους 58 ° C. Το βήμα αυτό το πραγματοποιούμε 2 φορές.

iv. Έγκλειση

Για την πραγματοποίηση της έγκλεισης πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

1. Τοποθετούμε την λιωμένη παραφίνη σε θερμή πλάκα.
2. Αφου κρυώσει λίγο (~2 sec) τοποθετώ τους ιστούς στην πλάκα .
3. Πάνω από την πλάκα τοποθετούμε την κασετίνα συγκράτησης και προσθέτουμε παραφίνη.
4. Όταν κρυώσει η παραφίνη παίρνουμε την κασετίνα με τον ιστό ο οποίος είναι έτοιμος για την τομή.



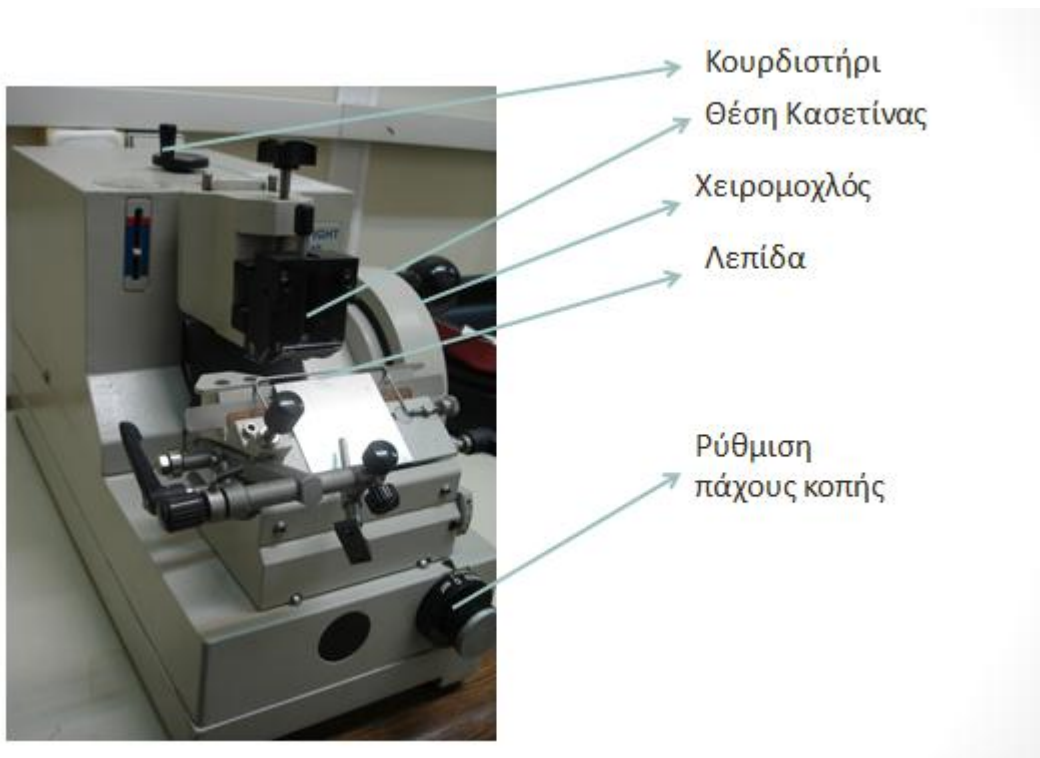
Τομή

Για την πραγματοποίηση της τομής στον μικροτόμο ακολουθήσαμε τα εξής βήματα :

1. Τοποθετούμε την κασετίνα σε ειδική θέση στο μικροτόμο.
2. Ρυθμίζουμε την απόσταση της λεπίδας από την κασετίνα όσο πιο κοντά γίνεται χωρίς όμως να ακουμπήσουν.
3. Ρυθμίζουμε το βήμα κοπής συνήθως 3, 5, 7μm, στην αρχή την ρυθμίζουμε σε μεγάλο βήμα 7 μm έτσι ώστε να φαγωθεί η παραφίνη που καλύπτει τον ιστό, και

όταν δούμε ότι πάει να κόψει και ιστό τότε την ρυθμίζουμε σε μικρότερο βήμα περίπου 3 μm

4. Γυρίζοντας το χειρομοχλό κινούμε την κασετίνα για να κόψουμε τομές με την λεπίδα
5. Παίρνουμε τις τομές που είναι τυλιγμένες και τις τοποθετούμε στο θερμό λουτρό έτσι ώστε να 'ανοίξουν' και να φύγει η παραφίνη, η θερμοκρασία του λουτρού είναι περίπου στους 47 ° C, η οποία ελέγχεται με έναν ψηφιακό θερμοστάτη.
6. Τέλος τις μαζεύουμε με τις αντικειμενοφόρες πλάκες (α.π.)

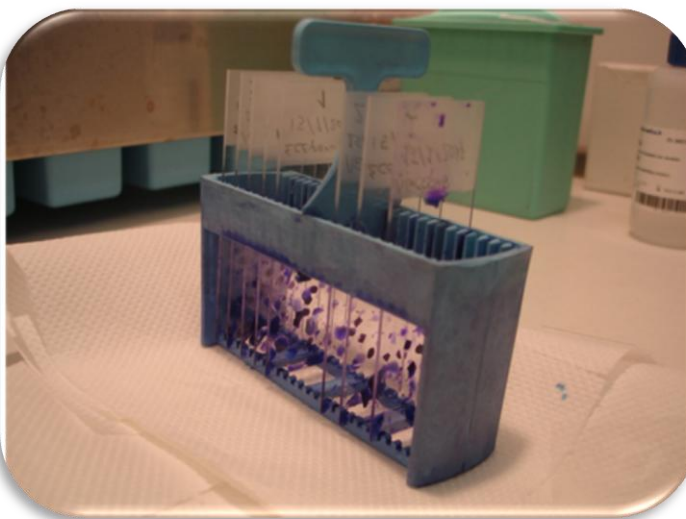


Χρώση

Για την χρώση ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία:

1. Ζεστάναμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες για 30 λεπτά στον κλίβανο στους 65o C
2. Αφαίρέσαμε την παραφίνη από τον ιστό με 4 διαδοχικά μπάνια σε Ξυλόλη για 3 λεπτά το καθένα , κανονικά το πρωτόκολλο αναφέρει για 5 λεπτά το καθένα, αλλά λόγω το ότι ήταν λεπτές οι τομές μας δεν το κρίναμε απαραίτητο.
3. Βάλαμε τον ιστό σε διάλυμα Acetone για ένα ξέβγαλμα
4. Ενυδατώσαμε τους ιστούς εμβαπτίζοντάς τον σε λουτρά αιθανόλης διαφορετικών περιεκτικοτήτων ως εξής :
 - σε Αιθανόλη 100% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 100% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 100% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά.

- σε Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 70% για 2.5 λεπτά.
 - σε Αιθανόλη 50% για 2.5 λεπτά.
 - Τέλος εμβάπτιση των ιστών σε αποσταγμένο νερό για 10 λεπτά.
5. Εμβάπτισαμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες με τους ιστούς σε διάλυμα 0.25 % βάρος κατ' όγκο κυανό της τολουϊδίνης για 2 λεπτά.
 6. Ξεπλύναμε τους ιστούς σε αποσταγμένο νερό.
 7. Εμποτίσαμε τους ιστούς για γρήγορη αφυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης για 10 δευτερόλεπτα στο κάθε διάλυμα αιθανόλης 50%, 70%, 96% και 100% αντίστοιχα.
 8. Εμβάπτισαμε τους ιστούς σε Ξυλόλη για 5 λεπτά
 9. Τοποθετήσαμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες κάτω από τον εξαερισμό για 20 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ξήρανση των ιστών.
 10. Τέλος καλύψαμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες με καλυπτρίδες βάζοντας ανάμεσα μια συνθετική ρητίνη που έχει βάση την Ξυλόλη.



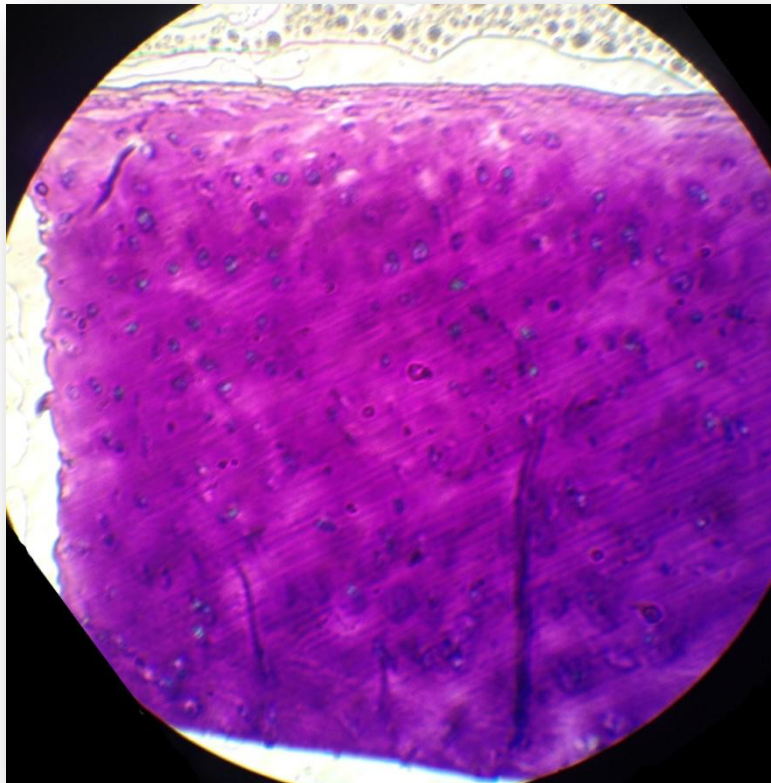
Οι ιστοί μετά την βαφή



Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με τις καλυπτρίδες

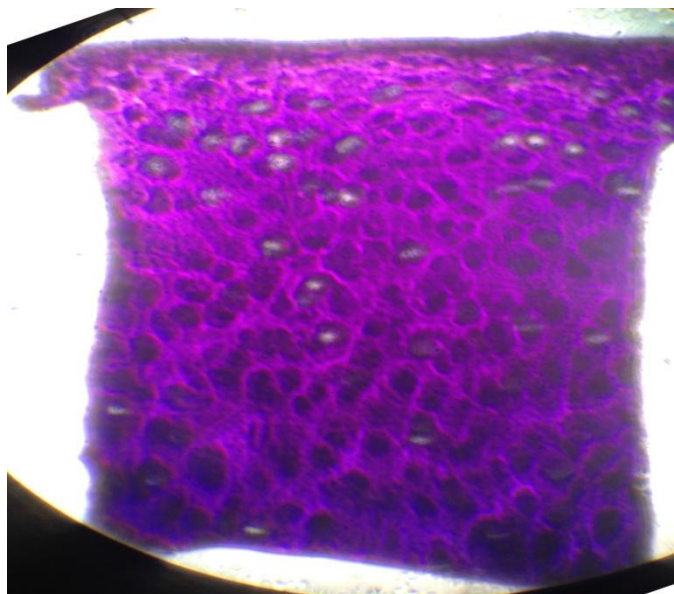
Εικόνες από το Μικροσκόπιο

Αυτή είναι η καλύτερη εικόνα που μπορέσαμε να πάρουμε από τα δείγματα που φτιάξαμε. Μπορούμε να παρατηρήσουμε τα χονδροκύτταρα μέσα στις κάψες τους στη μεσαία ζώνη. Η κατάσταση του χόνδρου δεν δείχνει να έχει κάποια μορφή αρθροπάθειας, επίσης βλέπουμε ότι στην περιφέρεια του χόνδρου έχουμε μια ομαλή επιφάνεια. Στο πάνω μέρος της φωτογραφίας βλέπουμε φυσαλίδες αέρα μέσα στην κόλλα-ρητίνη.



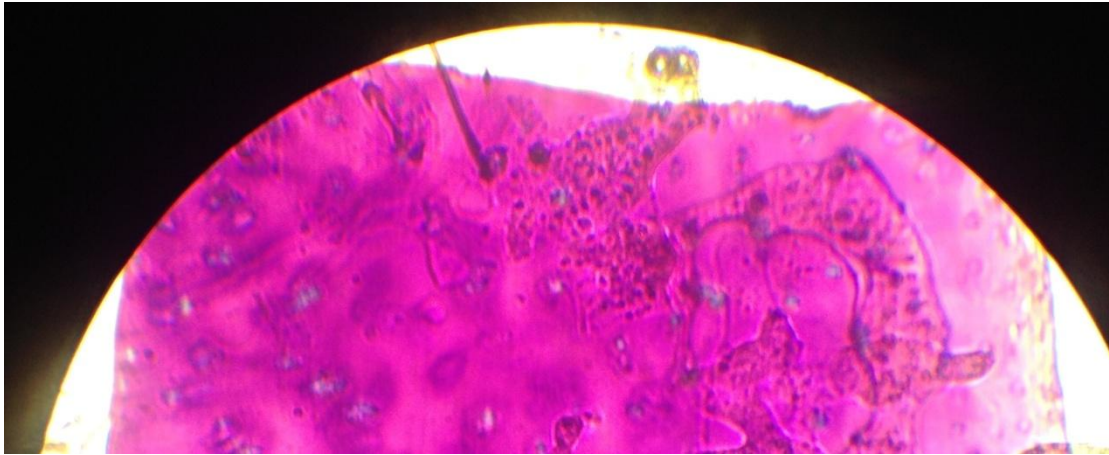
Εικόνα 1

Στην **εικόνα 2** βλέπουμε το αποτέλεσμα μιας φωτογραφίας στην οποία δεν έχει γίνει σωστή εστίαση. Μπορούμε όμως να παρατηρήσουμε τις κάψες των χονδροκυττάρων.



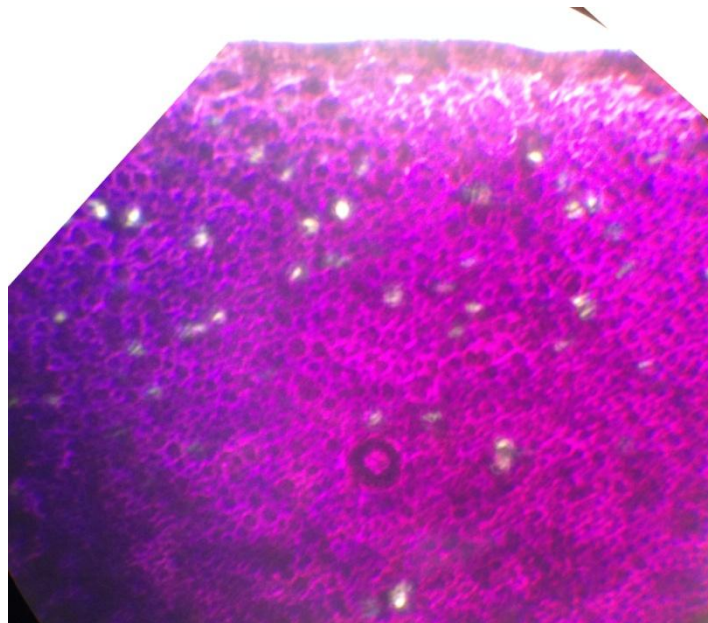
Εικόνα 2

Στην **εικόνα 3** βλέπουμε το αποτέλεσμα μη σωστής τοποθέτησης της κόλλας-ρητίνης. Όπου στο δεξιό τμήμα βλέπουμε τις φυσαλίδες αέρα μέσα στην κόλλα, που κάνουν την παρατήρηση του ιστού αδύνατη. Αντιθέτως, στο αριστερό τμήμα βλέπουμε μια καλή άποψη του ιστού με τα χονδροκύτταρα (άσπρα) να φαίνονται μέσα στις κάψες τους.



Εικόνα 3

Στην **εικόνα 4** βλέπουμε πάλι την επίδραση που έχει η λάθος τοποθέτηση της κόλλας. Βλέπουμε ότι η παρατήρηση του ιστού είναι αδύνατη, καθώς όλη η επιφάνειά του καλύπτεται από μικρές και μεγάλες φυσαλίδες αέρα.



Εικόνα 4

Συμπεράσματα και Προτάσεις

Συμπεράσματα

Η ιστολογία είναι ένας σημαντικός κλάδος της βιοϊατρικής καθώς με την μελέτη των ιστών και την διάκριση των διαφορων συστατικών τους μπορούμε:

- Να παρατηρήσουμε το φαινότυπο του ιστού σε μικροσκοπικό επίπεδο.
- Να δούμε σε τι κατάσταση βρίσκεται ο ιστός των διάφορων οργάνων, και κατά πόσο έχει επεκταθεί η ασθένεια από την οποία έχει προσβληθεί (στην περίπτωση μας οστεοαρθρίτιδα).
- Να διαγνώσουμε αν έχουν προσβληθεί τα κύτταρα που περικλείουν τον καρκινικό όγκο που έχει αφαιρεθεί.
- Οι χρόνοι κατα τη διαδικασία της χρώσης είναι σχετικοί και ανάλογοι της διαπερατότητας του ιστού από τα διάφορα διαλύματα.

Προτάσεις

- Αν η διαδικασία της σκλήνωσης γίνει σε κλίβανο με συνθήκες κενού τότε η απορόφηση του υλικού έγκλεισης από τον ιστό είναι καλύτερη και έτσι επιτυγχάνουμε καλύτερες τομές. Αυτή η διαδικασία είναι πολύ χρήσιμη στην περίπτωση που στον ιστό μας περιλαμβάνεται και οστό.
- Υδατολουτρό κάτω από το μικροτόμο ώστε να ανοίγουν και να συλλέγονται εκεί οι τομές κάνοντας έτσι ευκολότερη τη συλλογή τους με τις αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Διαφανή δοχεία κατά την διαδικασία της μονιμοποίησης, της αφυδάτωσης, της ενυδάτωσης και της διαύγασης, για να έχουμε την δυνατότητα παρατήρησης του ιστού κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών.
- Ομοιόμορφη κατανομή της κόλλας-ρητίνης μεταξύ της αντικειμενοφόρου πλάκας και της καλυπτρίδας ώστε να έχουμε καλύτερη επιφάνεια παρατήρησης.
- Η διαδικασία της αφυδάτωσης και της διαύγασης μπορεί να αυτοματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το “carousel” που υπάρχει στο εργαστήριο.



Βιβλιογραφία

1. Ιστολογία-Ορισμός, Μπορείτε να το βρείτε στο: el.wikipedia.org/wiki/ιστολογία
2. Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro ; Γενική Επιμέλεια: Κίττας Χρήστος ; Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Αγγελοπούλου Ρωξάνη. (2004), *Βασική ιστολογία (Basic histology)*, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις
3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ, Επιμέλεια : Λέκτορας ΠΑΥΛΙΔΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ, Νοέμβριος 2002
4. Paul R. Wheeler, H. George Burkitt, Victor G. Daniels, Γενική επιμέλεια : Κίττας Χρήστος, Λειτουργική Ιστολογία, 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίου, Αθήνα 2002, σ. 271-276
5. Paul R. Wheeler, H. George Burkitt, Victor G. Daniels, Γενική επιμέλεια : Κίττας Χρήστος, Λειτουργική Ιστολογία, 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίου, Αθήνα 2002, σ. 93-106
6. Paul R. Wheeler, H. George Burkitt, Victor G. Daniels, Γενική επιμέλεια : Κίττας Χρήστος, Λειτουργική Ιστολογία, 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίου, Αθήνα 2002, σ. 296-299
7. Johanne Martel-Pelletier, Christelle Boileau, Jean-Pierre Pelletier, Peter J. Roughley, Cartilage in normal and osteoarthritis, conditions, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, Vol. 22, No. 2, pp. 351–384, 2008
8. Cathy S. Carlson, Farshid Guilak , Thomas P. Vail , Jean F. Gardin, Virginia B. Kraus, Synovial fluid biomarker levels predict articular cartilage damage following complete medial meniscectomy in the canine knee, Journal of Orthopaedic Research, Vol. 20, 2002, 92—100
9. K. P. H. Pritzker, S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J.-P. Pelletier, P. A. Revell, D. Salter, Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging, OsteoArthritis and Cartilage, Vol. 14, 2006, pp. 13-29
10. Ελισάβετ Χατζοπούλου, Επιβλέπων καθηγητής: Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Διπλωματική Εργασία, *Συσχέτιση των μηχανικών ιδιοτήτων του αρθρικού χόνδρου με τον βαθμό εκφύλισης του*, Αθήνα, Ιούλιος 2012, σ. 86-98
11. Πρωτόκολλο Εργαστηρίου
12. Tissue (biology), Διατίθεται στο: [http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_(biology))